

20. Feb. 2004 (20.02.2004)

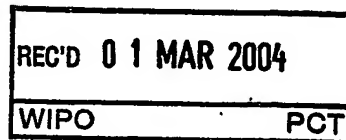


Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

PTY #2



Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02022869.8

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

BEST AVAILABLE COPY R C van Dijk



Anmeldung Nr:
Application no.: 02022869.8
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 14.10.02
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Cardion AG
Max-Planck-Strasse 15a
40699 Erkrath
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Interleukin-15 Antagonisten und ihre Verwendung zur Prophylaxe und/oder Therapie
von Transplantationsfolge- und/oder Autoimmunerkrankungen

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

C07K16/00

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE SK TR

- 1 -

Cardion AG

14. Oktober 2002
2002CAR004EP**Interleukin-15 Antagonisten und ihre Verwendung zur Prophylaxe und/oder
Therapie von Transplantationsfolge- und/oder Autoimmunerkrankungen**

5

Die Erfindung betrifft Fusionsproteine aus einem Wildtyp-IL-15 und einem IgG-Fc-Fragment sowie ihre Herstellung und Verwendung zur Inhibierung von Immunreaktionen und zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolge- und/oder Autoimmunerkrankungen.

10

Eine effektive Immunantwort wird durch die Aktivierung von T-Zellen des Immunsystems, die durch ein Antigen oder Mitogen ausgelöst wird, eingeleitet. Die Aktivierung der T-Zellen erfordert zahlreiche zelluläre Veränderungen, hierzu gehören z.B. die Expression von Cytokinen und deren Rezeptoren. Zu diesen Cytokinen gehören unter anderem IL-15 und IL-2.

15

IL-15 und IL-2 sind bekannte Wachstumsfaktoren, die eine signifikante Rolle spielen in der Proliferation und Differenzierung von humanen und murinen T-Zellen, Makrophagen, natürlichen Killer (NK)-Zellen, cytotoxischen T-Zellen (CTL), Lymphozyt-aktivierten Killer (LAK)-Zellen sowie in der Kostimulation von B-Zellen, die beispielsweise durch anti-Immunoglobulin (anti-IgM) oder Phorbol ester aktiviert worden sind. Die Proliferation dieser Zellen verstärkt die Immunantwort eines Organismus.

25

IL-15 wurde erstmals als ein sekretorisches Cytokin beschrieben, das die Proliferation von IL-2 abhängigen murinen cytotoxischen T-Zellen (CTLL-2) induziert. IL-15 wurde als ein 162 Aminosäuren langes Vorläuferprotein mit einer Leader-

- 2 -

Sequenz von 48 Aminosäuren, also einem reifen Protein von 114 Aminosäuren Länge, charakterisiert (Grabstein et al., (1994) Science 264(5161):965-8).

5 IL-15 wird in Epithel- und Fibroblast-Zelllinien sowie Monocyten des peripheren Blutes gebildet. Seine spezifische mRNA wurde ebenfalls in Plazenta, Skelettmuskeln und Nieren gefunden (Grabstein et al., supra)

10 Neben den gemeinsamen biologischen Eigenschaften, besitzen IL-15 und IL-2 ebenfalls homologe Strukturen. Beide Moleküle binden an mindestens drei getrennte Rezeptor-Untereinheiten auf der Membran von T-Zellen, wobei der beta- und der gamma-Untereinheit-Komplex über den die Signaltransduktion erfolgt derselbe ist, während die alpha-Untereinheit spezifisch für die Bindung von IL-15 bzw. IL-2 ist. Es konnte festgestellt werden, dass gegen die alpha-Untereinheit des IL-2 Rezeptors gerichtete Antikörper keinen Effekt auf die IL-15 Bindung an seine spezifische alpha-Untereinheit ausüben (Grabstein et al., supra), wohingegen Antikörper, die gegen die beta-Untereinheit des IL-2 Rezeptors gerichtet waren, die Aktivität von IL-15 blockieren (Giri et al., (1994) EMBO J., 13:2822). Über die beta- und gamma-Untereinheiten von IL-15 erfolgt die Signaltransduktion.

20 Bei zahlreichen Krankheiten ist es aus therapeutischen Gründen erforderlich, eine Antwort des Immunsystems des Patients zu supprimieren. Hierzu gehören beispielsweise Autoimmunkrankheiten, insbesondere Diabetes mellitus Typ I (Bottazzo, G. F., et al., (1985) N Engl J Med 113:353), rheumatische Arthritis, Multiple Sklerose, chronische Lebererkrankungen, entzündliche Darmerkrankungen, Transplantat-anti-Wirt-Krankheit (graft-versus-host disease [GVHD]) und Transplantat-Abstoßung (Sakai et al., (1998) Gastroenterology, 114(6):1237-1243; Kivisakk et al., (1998) Clin Exp Immunol, 111(1):193197).

30 Werden immunkompetente Zellen von einem genetisch nicht identischen Organismus übertragen, so kommt es zur Reaktion dieser Zellen gegen den Empfänger

gerorganismus (GVHD) (Janeway C.A. u. Travers P., Spektrum-Verlag, deutsche Auflage 1995 S. 467).

- Für viele lebensbedrohende Krankheiten ist die Transplantation von Organen oder Geweben zur Standardmethode und in zahlreichen Fällen zur einzig lebensretten-
den Behandlung geworden. Schwierigkeiten gibt es jedoch im Hinblick auf Ab-
stoßungsreaktionen des Empfängerorganismus, die durch Immunantworten auf die
fremden Zelloberflächen-Antigene des Transplantats hervorgerufen werden.
- Bei einer Transplantation ist der Grad einer Transplantatabstoßung von dem
Ausmaß der histogenetischen Differenz zwischen Spender und Empfänger (Histo-
kompatibilität) abhängig. Unterschiede im Antigenmuster von Spender- und Emp-
fängerorganismus rufen in letzterem eine Immunreaktion, resultierend in einer
Abstoßungsreaktion, gegen das Transplantat hervor. Die Abstoßung eines Trans-
plantates findet sowohl durch humorale als auch zelluläre Reaktionen statt. Hu-
morale Effektoren sind Antikörper unterschiedlicher Spezifität, wie z.B. Antikör-
per-abhängige zellvermittelte Cytotoxizität und Antikörper gegen Strukturen des
Spender-HLA-Systems. Zelluläre Effektoren stellen insbesondere cytotoxische T-
Zellen in Verbindung mit u.a. Makrophagen statt (Immunologie, Janeway C.A. u.
Travers P., Spektrum-Verlag, deutsche Auflage 1995 S. 522-8).

Ein Therapieansatz ist es, die humorale bzw. zelluläre Immunantwort durch Im-
munsuppressiva, insbesondere antagonistische IL-15 bzw. IL-2-Antikörper bzw.
IL-15 bzw. IL-2 Antagonisten zu supprimieren. Weiterhin sind Antikörper gegen
den IL-2-Rezeptor bereits zur Verhinderung der akuten Abstoßung bei Nieren-
transplantationen zugelassen (Novartis, Basel, Schweiz; Roche, Basel, Schweiz;
Zenapax; Simulect).

Verschiedene Therapien unter Verwendung von Antikörpern gegen IL-15 bzw.
IL-2 Moleküle sind beschrieben worden. So konnte beispielsweise die verlängerte
Überlebensdauer eines allotransplantierten Primatenherzen durch die Verabrei-

- 4 -

chung des monoklonalen Antikörpers anti-IL-2R.beta (Mik.beta-1) erreicht werden (Tinubu et al., (1994) J Immunol. 153:4330). Weiterhin wurde eine Blockierung der Transplantatabstoßung durch monoklonale Antikörper, die gegen das T-Zell spezifische Antigen CD3 gerichtet waren, beschrieben (Mackie et al., (1990) TransPlantation 49:1150).

Des weiteren sind zahlreiche IL-15 Antagonisten beschrieben worden, die das Bindungsverhalten von IL-15 an seinen Rezeptor verändern. Diese Antagonisten wurden durch Einführung von Mutation(en) in die Sequenz des Wildtyp-IL-15 erzielt. So wurde beispielsweise eine Mutation an der Aminosäureposition 56 (Aspartat) [Position 8 nach Abspalten der Leader-Sequenz] beschrieben, durch die zwar eine Bindung an die alpha-Untereinheit des IL-15 Rezeptors erfolgte, jedoch die Bindung an die beta-Untereinheit verhindert wurde (WO 96/26274). In einem anderen Ansatz wurde durch eine Mutation an der Aminosäureposition 156 (Glutamin) [Position 108 nach Abspalten der Leader-Sequenz] die Interaktion mit der gamma-Untereinheit inhibiert (WO 96/26274; WO 97/41232). Weiterhin wurde durch PEGyliertes IL-15 eine Bindung an die alpha-Untereinheit ermöglicht. Aus sterischen Gründen war jedoch eine Bindung an die beta-Untereinheit nicht mehr möglich (Pettit et al., (1997) J Biol Chem, 272 4: 2312-2318).

Bei den beschriebenen IL-15 Antagonisten handelt es sich um mutierte IL-15 (mut-IL-15) Sequenzen, die entweder für sich oder als Fusionsprotein antagonistische Wirkungen erzielten. Derartige Fusionsproteine sind Polypeptide, bestehend aus einem N-terminalen mut-IL-15-Fragment und einem C-terminalen Fc-Fragment, insbesondere einem murinen IgG2a oder humanen IgG1 (WO 97/41232; Kim et al., (1998) J Immunol., 160:5742-5748).

Unter einem Fc (Fragment crystallizable) -Fragment ist das Fragment eines Antikörpers zu verstehen, das keine Antigene bindet. Die beiden weiteren identischen Fab (Fragment antigen binding) -Fragmente eines Antikörpers haben antigenbin-

- 5 -

dende Aktivität (Immunologie, Janeway C.A. u. Travers P., Deutsche Auflage (1995), S. 117-8).

5 Nachteil dieser mutierten IL-15 Moleküle ist jedoch, dass sie gegenüber dem Wildtyp-IL-15 eine veränderte Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen und dadurch abweichende Degradationspunkte aufweisen, so dass Degradationsprodukte auftreten, die in den Zellen natürlicherweise nicht vorkommen, und die toxische Wirkung in dem Organismus entfalten können. Art und Ausmaß derartiger und anderer Nebenwirkungen sind im Detail nicht absehbar.

10

Weiterer Nachteil ist, dass Patienten, die Transplantate in sich tragen, diese in der Regel Zeit ihres Lebens behalten, so dass sie lebenslang auf die Einnahme von Immunsuppressiva angewiesen sind. Vor allem dadurch, dass nur unzureichende Erkenntnisse über die Nebenwirkungen der Langzeiteinnahme solcher Immun-
15 suppressiva vorliegen, besteht dringender Bedarf, diese Nebenwirkungen auszuschließen oder mindestens einzuschränken.

Nachgewiesen wurde bei der Verabreichung immunsuppressiver Komponenten, wie Cyclosporine A, FK506 und Rapamycin, dass diese Agenzien die Proliferation von T-Zellen insgesamt inhibieren (Penn, (1991) Transplant Proc, 23:1101; Beveridge et al., (1984) Lancet 1:788).
20

Ein großer Nachteil ist, dass die in der Regel systemische Verabreichung solcher Immunsuppressiva zur Verteilung derselben im gesamten Organismus führt und
25 nicht die lokale Präsenz am Ort des/der transplantierten Zellen, Gewebes oder Organs gewährleistet. Die Inhibierung der T-Zellproliferation im gesamten Organismus kann jedoch Infektionen, toxische Abbauprodukte oder sogar Krebs hervorrufen.

- 6 -

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Immunsuppressivum herzustellen, das keine bzw. kaum Nebenwirkungen in einem Organismus entfaltet, in welchem eine Immunantwort inhibiert werden soll.

- 5 Es ist bekannt, dass mutierte IL-15 Moleküle oder Fusionsproteine, bestehend aus einem mut-IL-15 und einem Fc-Fragment eine antagonistische Wirkung auf IL-15 entfalten, indem sie das Rezeptorbindungsverhalten inhibieren oder verändern.

- Völlig überraschend war allerdings, dass auch ein Fusionsprotein, bestehend aus
10 einem N-terminalen Wildtyp-IL-15 und einem C-terminalen Fc-Fragment, insbesondere einem murinen IgG2a, ebenfalls eine antagonistische Wirkung entfaltet, obwohl an sich eine agonistische Wirkung zu erwarten wäre. Lediglich durch das Anfügen eines Fc-Fragments an ein natürlich vorkommendes, im Normalfall ein immunstimulierendes IL-15 Molekül konnte der Wirkmechanismus, umgekehrt
15 werden, also die Inhibierung einer Immunantwort erreicht werden.

- Überraschend war diese Erkenntnis gerade deshalb, weil bei der Annahme einer natürlichen Faltung des Wildtyp-IL-15-Abschnitts des Fusionsproteins nicht davon auszugehen war, dass das Rezeptorbindungsverhalten allein durch das ange-
20 fügte Fc-Fragment derart veränderbar ist, dass das gesamte Molekül Wildtyp-IL-15-Fc antagonistische Wirkung zum Wildtyp-IL-15 entfaltet.

- Ein Gegenstand der Erfindung ist daher ein Fusionsprotein aus einerseits einem Wildtyp-IL-15 und andererseits einem IgG-Fc-Fragment, mit Ausnahme eines
25 murinen IgG2b-Fc-Fragments.

- Unter einem Fusionsprotein gemäß der vorliegenden Erfindung ist das Expressionsprodukt eines fusionierten Gens zu verstehen. Ein fusioniertes Gen entsteht aus der Verknüpfung zweier oder mehrerer Gene oder Genfragmente, wodurch
30 eine neue Kombination entsteht.

- 7 -

Unter einem Wildtyp-IL-15 gemäß der vorliegenden Erfindung wird das natürlich vorkommende IL-15 verstanden, wie beispielsweise in Grabstein et al., (1994) Science 264(5161):965-8 beschrieben.

- 5 Unter einem Fc(Fragment crystallizable)-Fragment ist das Fragment eines Antikörpers zu verstehen, das keine Antigene bindet. Das Fc-Fragment kann aus natürlicher Quelle stammen, rekombinant hergestellt werden und/oder synthetisiert werden. Entsprechende Methoden sind dem Fachmann bekannt.
- 10 Bei dem Fc-Fragment des erfindungsgemäßen Fusionsproteins handelt es sich um ein ImmunglobulinG (IgG) und zwar um ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, vorzugsweise um ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, insbesondere um ein IgG1. Vorzugsweise wurden die IgG's ab der Hinge-Region verwendet.
- 15 Als Hinge-Region wird die flexible Region im Ig-Molekül bezeichnet.

Unter erfindungsgemäßen IgG's sind beispielsweise folgende beschriebene IgG's zu verstehen:

- humanes IgG1 (Paterson, T. et al., (1998), Immunotechnology 4(1):37-47, murines IgG2a (Sikorav, J.L., (1980), Nucleic Acids Res. 8(14):3143-3155), murines IgG1 (French et al., (1991), J. Immunol. 146(6):2010-2016, humanes IgG2 (Krawinkel, U. und Rabbitts, T.H., (1982), EMBO J. 1(4):403-407; Wang et al., (1980), J. Immunol. 125(3):1048-1054), murines IgG2b (Schlomchik, M.J., (1987), Nature 328, 805-811), humanes IgG3 (Huck, S. et al., (1986), Nucleic Acids Res. 14(4):1779-1789), murines IgG3 (Wels et al., (1984), EMBO J., 3(9):2041-2046) und humanes IgG4 (Pink et al., (1970), Biochem. J., 117(1):33-47) beschrieben worden.
- 20
- 25

- Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Fusionsprotein ein chimäres Fusionsprotein, beispielsweise enthaltend ein Wildtyp-IL-15 und ein heterologes IgG1-Fc-Fragment oder ein heterologes IgG2a-Fc-Fragment.
- 30

In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das erfindungsgemäße Fusionsprotein die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, die für ein Fusionsprotein kodiert, das einerseits ein Wildtyp-IL-15 und andererseits ein IgG-Fc-Fragment, mit Ausnahme eines murinen IgG2b-Fc-Fragments, enthält.

10 Vorzugsweise kodiert die erfindungsgemäße Nukleinsäure für ein Wildtyp-IL-15 und ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, besonders bevorzugt für ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, am bevorzugtesten für ein IgG1.

15 Bevorzugt kodiert die erfindungsgemäße Nukleinsäure ein Fusionsprotein mit einer der Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5.

In bevorzugten Ausführungsformen enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure
20 die DNA-Sequenzen SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 oder SEQ ID NO:10.

Unter einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man eine RNA oder DNA, insbesondere genomische DNA, cDNA oder synthetische DNA,
25 die beispielsweise auf Phosphoramidierungsebene synthetisiert wurde. Ebenfalls sind Kombinationen und/oder Modifikationen von Nukleotiden dieser Nukleinsäuren umfasst. Weiterhin umfasst dieser Begriff einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren.

30 Ebenso umfasst sind Nukleinsäuren, die funktionell verknüpfte Komponenten beinhalten, beispielsweise ein oder mehrere fusionierte Gene oder aktive Teile

- 9 -

davon kodierend für ein oder mehrere erfindungsgemäße Fusionsproteine sowie regulierbare Elemente und/oder regulative Nukleotidsequenzen, die die Expression des/der Gene mengenmäßig und/oder zeitabhängig beeinflussen.

- 5 Regulierbare Elemente sind beispielsweise Promotoren für die konstitutive oder zell- bzw. gewebsspezifische Expression.

- Regulative Nukleotidsequenzen umfassen beispielsweise Leadersequenzen, Polyadenylierungssequenzen, z.B. ein SV40-Polyadenylierungssignal,
10 Enhancersequenzen, IRES-Sequenzen und Introns.

Bevorzugte Leadersequenzen der vorliegenden Erfindungen sind beispielsweise die nachfolgend aufgeführten:

- 15 Igk-Leader:
5'-ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTC
AGGTTCCACTGGTGAC-3',

- CD5-Leader:
20 5'-ATGCCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGCCACCTTGACCTGCTGGG
GATGCTGGTTCGCTTCCTGCCTCGGA-3',

- CD4-Leader:
5'-ATGAACCGGGGAGTCCCTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACT
25 GCGCTCCTCCCAGCAGCCACTCAGGGA-3',

- IL-2-Leader:
5'-ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATTGCACTAAGTCTTGCACT
TGTCACAAACAGT-3',
30

- 10 -

MCP-Leader:

5'-TGAAAGTCTCTGCCGCCCTTCTGTGCCTGCTGCTCATAGCAGCCACC
TTCATTCCCCAAGGGCTCGCT-3',

5

kurzer nativer IL-15-Leader:

5'-ATGTCTTCATTTTGGGCTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAA-3'

langer nativer IL-15-Leader:

10 ATGAGAATTTGAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGCTACTTGTGTT
TACTTCTAAACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTGGCATTTCATGTCTTCATTTTGGG
CTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAAAACAGAAGCC

15 Die Komponenten sind funktionell verknüpft, wenn sie derart verbunden sind,
dass unter dem Einfluss der Transkriptionsregulation die Sequenz(en) der bzw.
des enthaltenen Gene bzw. Gens transkribiert werden bzw. wird.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält.

20

Vektoren im Sinne der vorliegenden Erfindung können Plasmide, Shuttle-Vektoren, Phagemide, Cosmide, adenovirale Vektoren, retrovirale Vektoren, Expressionsvektoren und gentherapeutisch wirksame Vektoren sein.

25 Expressionsvektoren im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, mindestens ein Translations-Initiations-Signal, ein Translations-Terminations-Signal und/oder ein Polyadenylierungs-Signal zur Expression in Eukaryoten.

- 11 -

Kommerziell erhältliche Expressionsvektoren, insbesondere zur Expression in Säugetierzellen, beispielsweise pIRES (Fa. Clontech, Palo Alto, USA), pCI-neo Vektor (Fa. Promega, Madison, USA), pCMV-Script (Fa. Stratagene, La Jolla, USA) und pCDNA Vektor (Fa. Invitrogen, Paisley, UK), sind zum Einbau der

5 erfindungsgemäßen NS geeignet.

Erfindungsgemäße gentherapeutisch wirksame Vektoren sind zum Beispiel Virusvektoren, beispielsweise Adenovirus-Vektoren, retrovirale Vektoren oder Vektoren, die auf Replikons von RNA Viren beruhen (Lindemann et al., 1997, Mol.

10 Med. 3: 466-76; Springer et al., 1998, Mol. Cell. 2: 549-58; Khromykh, 2000, Curr. Opin. Mol. Ther.; 2: 555-69).

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, dass man die erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Fragmente mit Liposomen komplexiert. Bei

15 der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, dass eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu 100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den Lipidmischungen

20 DOTMA (1,2-dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DPOE (dioleoylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Transfektionseffizienz bei verschiedenen Zelllinien getestet. (Behr et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982-6986; Gao und Huang, 1991, Biochem. Biophys. Acta 1189, 195-203; Felgner et al. 1994, J.

25 Biol. Chem. 269, 2550-2561). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl-ammoniummethyl-sulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; diocta-decylamidoglycylspermin). Hilfsstoffe, die den Transport von Nukleinsäuren in die Zellen erhöhen, können beispielsweise Proteine oder Peptide, die an DNA gebunden sind oder synthetische Peptid-

30 DNA-Moleküle, die den Transport der Nukleinsäure in den Kern der Zelle ermög-

- 12 -

lichen, sein (Schwartz et al., 1999, Gene Therapy 6: 282; Branden et al. 1999, Nature Biotech. 17: 784). Hilfsstoffe umfassen auch Moleküle, die die Freisetzung von Nukleinsäuren in das Zytoplasma der Zelle ermöglichen (Planck et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918; Kichler et al., 1997, Bioconj. Chem. 8, 213) oder beispielsweise Liposomen (Uhlmann und Peimann, 1990, Chem. Rev. 90, 544).

Ein Gegenstand der Erfindung ist eine Zelle, die mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und/oder mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor enthält.

Bevorzugt handelt es sich bei dieser Zelle um eine Vorläuferzelle, eine immortalisierte Zelle oder eine Stammzelle, insbesondere eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle. Derartige pluripotente embryonale Stammzellen oder Zelllinien können aus der inneren Zellmasse von Blastozyten gewonnen werden (Robertson, Embryo-derived stem cell lines, in Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, Robertson, editor, IRL Press, Washington DC, 1987). Besonders bevorzugte Stammzellen, die aus adultem Gewebe stammen, umfassen z.B. neuronale Stammzellen, Stammzellen aus dem Knochenmark, mesenchymale Stammzellen, hämatopoetische Stammzellen, epitheliale Stammzellen, Stammzellen aus dem Verdauungstrakt und Duktus Stammzellen.

Erfindungsgemäße Zellen sind beispielsweise Epithelzellen, Gefäßzellen, Leberzellen, Herzzellen, Hautzellen, Muskelzellen, Nervenzellen, Knochenmarkzellen, CHO-Zellen (Ovarzellen) und Zellen aus der Bauchspeicheldrüse, aus der Niere, aus dem Auge oder aus der Lunge.

Die erfindungsgemäße Zelle ist insbesondere eine Säugetierzelle, inklusive einer humanen Zelle. Diese Zelle kann beispielsweise aus einem Menschen, einer

Maus, einer Ratte, einem Meerschweinchen, einem Kaninchen, einer Kuh, einer Ziege, einem Schaf, einem Pferd, einem Schwein, einem Hund, einer Katze oder einem Affen, vorzugsweise aus einem Menschen, stammen.

- 5 Die erfindungsgemäßen Zellen können auch zur Expression eines heterologen Gens verwendet werden.

Vorzugsweise liegt die erfindungsgemäße Zelle in Form einer Zelllinie vor. Eine erfindungsgemäße Zelllinie kann hergestellt werden durch Transfektion, Transformation oder Infektion einer Zelllinie mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder einem erfindungsgemäßen Vektor mit Hilfe von Methoden, die dem Fachmann geläufig sind, beispielsweise Transfektion, Transformation, Elektroporation, Mikroinjektion oder Infektion.

- 15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel enthaltend mindestens ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein, mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor und/oder mindestens eine erfindungsgemäße Zelle und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.

20 Geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, die beispielsweise der Stabilisierung oder Konservierung des Arzneimittels oder Diagnostikums dienen, sind dem Fachmann allgemein bekannt. Beispiele für solche Hilfs- und/oder Zusatzstoffe sind physiologische Kochsalzlösungen, Ringer-Dextrose, Dextrose, Ringer-Laktat, entmineralisiertes Wasser, Stabilisatoren, Antioxidantien, Komplexbildner, antimikrobielle Verbindungen, Proteinaseinhibitoren und/oder inerte Gase.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann z.B. zur Prophylaxe, Therapie oder Diagnose von Erkrankungen dienen. Zu diesen Krankheiten gehören beispielsweise:

- 14 -

- rheumatischen Erkrankungen, beispielsweise rheumatische Arthritis, Sjögren's Syndrom, Skleroderma, Dermatomyositis, Polymyositis, Reiter's Syndrom oder Behcet's Krankheit,
- Diabetes Typ I oder Typ II,
- 5 · Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse, beispielsweise Morbus Basedow Krankheit, Hashimoto's Thyroiditis,
- Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems, beispielsweise Multiple Sklerose,
- Hauterkrankungen, beispielsweise Psoriasis, Neurodermitis,
- 10 · entzündliche Darmerkrankungen, beispielsweise Morbus Crohn,
- Immunstörungserkrankungen, beispielsweise AIDS
- Gefäßerkrankungen,
- Transplantationsfolgeerkrankungen, beispielsweise Transplantatabstoßungsreaktionen und
- 15 · Tumorerkrankungen.

Die Verabreichung des erfindungsgemäßen Arzneimittels erfolgt nach den dem Fachmann geläufigen Methoden, beispielsweise intravenös, intraperitoneal, intramuskulär, subkutan, intrakranial, intraorbital, intrakapsulär, intraspinal, trans-

20 · muskulär, topikal oder oral. Weitere Methoden der Verabreichung sind beispielsweise die systemische oder lokale Injektion, die Perfusion oder die Katheterbasierte Verabreichung.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann beispielsweise in oralen Darreichungs-

25 · form, wie z.B. Tabletten oder Kapseln, über die Mucous-Membran, z.B. die Nase oder die Mundhöhle, in Form von Sprays in die Lunge oder in Form von Dispositionen unter die Haut implantiert, verabreicht werden. Trans-dermal-

- 15 -

therapeutische Systeme (TTS) sind z.B. aus EP 0 944 398-A1, EP 0 916 336-A1, EP 0 889 723-A1 oder EP 0 852 493-A1 bekannt.

Das Arzneimittel kann in den Organismus eingebracht werden entweder mit Hilfe eines *ex vivo* Ansatzes, bei dem die Zellen aus dem Patienten entfernt, genetisch modifiziert, beispielsweise durch DNA-Transfektion, und danach erneut in den Patienten eingeführt werden oder mit Hilfe eines *in vivo* Ansatzes, bei welchem erfindungsgemäße gentherapeutisch wirksame Vektoren in den Körper des Patienten eingebracht werden, als nackte DNA oder unter Verwendung von viralen oder nicht-viralen erfindungsgemäßen Vektoren oder erfindungsgemäßen Zellen.

Im Stand der Technik ist bekannt, dass die Dosierung von Arzneimitteln von mehreren Faktoren abhängt, beispielsweise von dem Körpergewicht, dem generellen Gesundheitszustand, dem Ausmaß der Körperoberfläche, dem Alter des Patienten sowie der Wechselwirkung mit anderen Medikamenten. Eine Dosierung hängt ebenfalls ab von der Art der Verabreichung. Die Dosierung ist daher im Einzelfall für jeden Patienten vom Fachmann zu bestimmen. Die Verabreichung des Arzneimittels kann einmal oder mehrmals am Tag und über mehrere Tage hinweg erfolgen, auch dies ist vom Fachmann bestimmbar.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder ein humanes oder tierisches Säugetierorgan, enthaltend mindestens ein Fusionsprotein, mindestens eine Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens eine Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält.

- 16 -

Bevorzugt enthält das Fusionsprotein des erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder des erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans einerseits ein Wildtyp-IL-15 und andererseits ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein murines IgG2b, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, bevorzugt ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, insbesondere ein IgG1, besonders bevorzugt kein murines IgG2b.

Humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe der vorliegenden Erfindung kann beispielsweise Gewebe aus der Bauchspeicheldrüse, einschließlich beispielsweise der Langerhanschen Inselzellen, sowie Herz-, Herzmuskel-, Nieren-, Leber-, Lungen-, Milz-, Knorpel-, Bänder-, Retina-, Hornhaut-, Knochenmark-, Haut-, Nerven- und/oder Muskelgewebe sein.

Humane oder tierische Säugetierorgane der vorliegenden Erfindung können z.B. die Bauchspeicheldrüse, das Herz, die Bauchspeicheldrüse, die Niere, die Leber, die Lunge, die Milz, das Auge und/oder die Haut sein.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein transgenes nicht-humanes Säugetier, welches mindestens ein Fusionsprotein, mindestens eine Nukleinsäure, die für das genannte Fusionsprotein kodiert, mindestens einen Vektor, der mindestens eine genannte Nukleinsäure enthält und/oder mindestens eine Zelle, die mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens einen genannten Vektor enthält, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält.

Bevorzugt enthält das Fusionsprotein des erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers einerseits ein Wildtyp-IL-15 und andererseits ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein murines IgG2b, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, bevorzugt ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, insbesondere ein IgG1, besonders bevorzugt kein murines IgG2b.

- 17 -

Transgene Tiere zeigen im allgemeinen eine gewebespezifisch erhöhte Expression von Nukleinsäuren und sind daher für die Analyse beispielsweise von Immunreaktionen sehr geeignet. Bevorzugt werden transgene Mäuse verwendet.

5

Ein erfindungsgemäßes nicht-humanes Säugetier ist beispielsweise eine Maus, eine Ratte, ein Meerschweinchen, ein Kaninchen, eine Kuh, eine Ziege, ein Schaf, ein Pferd, ein Schwein, ein Hund, eine Katze oder ein Affe.

10

Ebenfalls weitere Gegenstände der Erfindung sind die Verwendungen eines Fusionsproteins, einer Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, eines Vektors enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einer Zelle enthaltend entweder mindestens eine genannte Nukleinsäure oder/und einen genannten Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans:

15

- zur Inhibierung eines IL-15 vermittelten zellulären Ereignisses,
- zur Inhibierung der Interaktion eines IL-15 mit seinem Rezeptor und/oder
- 20 • zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen, insbesondere Transplantationsabstoßungsreaktionen, und/oder Autoimmunerkrankungen.

20

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Fusionsproteins, einer Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, eines Vektors enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einer Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, zur Lyse von Zellen, die einen IL-15-Rezeptor exprimieren.

30

- 18 -

Bevorzugt enthält das Fusionsprotein der erfindungsgemäßen Verwendungen einerseits ein Wildtyp-IL-15 und andererseits ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein murines IgG2b, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, bevorzugt ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, insbesondere ein IgG1, besonders bevorzugt kein murines IgG2b.

Vorzugsweise erfolgen die erfindungsgemäßen Verwendungen in bzw. bei einem humanen oder tierischen Säugetier. Unter einem humanen Säugetier im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Mensch zu verstehen, unter einem tierischen Säugetier im Sinne der vorliegenden Erfindung ist beispielsweise eine Maus, eine Ratte, ein Meerschweinchen, ein Kaninchen, eine Kuh, eine Ziege, ein Schaf, ein Pferd, ein Schwein, ein Hund, eine Katze oder ein Affe zu verstehen.

Weiterhin ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung des erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans zur Transplantation in ein humanes oder tierisches Säugetier. Bevorzugt handelt es sich um eine Auto-, Allo- oder Xenotransplantation.

Die Transplantation ist die Übertragung von lebendem Material, z.B. von Zellen, Gewebe oder Organen, von einem Teil des Körpers auf einen anderen (autogene Transplantation) oder von einem Individuum auf ein anderes (allogene, syngene und xenogene Transplantation) (Klein, J. S. (1991) Immunologie, 1. Auflage, VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 483) nach dem Fachmann allgemein bekannten Verfahren. Bei der Transplantation in einen anderen Organismus wird unterschieden in die

- Synotransplantation, bei der Spender und Empfänger derselben Spezies angehören und genetisch völlig oder weitgehend identisch sind,
- Allotransplantation, bei der Spender und Empfänger derselben Spezies angehören, aber immunogenetisch different sind und

Xenotransplantation, bei der Spender und Empfänger nicht derselben Spezies angehören und demzufolge immunogenetisch völlig different sind.

Ebenfalls ein Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins, das die folgenden Schritte enthält:

- a. Einbringen mindestens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder mindestens eines erfindungsgemäßen Vektors in eine Zelle, und
- b. Expression der Nukleinsäure unter geeigneten Bedingungen.

- 10 Verfahren zum Einbringen von Nukleinsäuren, Vektoren und Genen, beispielsweise Differenzierungs-Markergenen oder Transfektions-Markergenen, in Zellen sind dem Fachmann gut bekannt und umfassen die nach dem Stand der Technik üblichen Verfahren, beispielsweise Elektroporation, Injektion, Transfektion und/oder Transformation. Diese Verfahren sind insbesondere bevorzugt, wenn es
- 15 sich bei der Substanz um nackte Nukleinsäuren, insbesondere DNA, handelt.

- Geeignete Bedingungen für die Expression der Nukleinsäure können beispielsweise durch Expressionsvektoren, beispielsweise durch vorangehend genannte Expressionsvektoren und regulierbare Elemente, beispielsweise Promotoren oder
- 20 regulative Nukleinsäuresequenzen geschaffen werden. Im allgemeinen enthalten Expressionsvektoren auch für die jeweilige Zelle bzw. das jeweils zu transkribierende Gen geeignete Promotoren.

- Beispiele für regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die von der RNA-Polymerase II erkannt werden.
- 25 Solche Promotoren für die konstitutive Expression in allen Zell- und Gewebetypen sind z.B. der CD11c-Promotor, pGk (Phosphoglyceratkinase)-Promotor, der CMV (Cytomegalievirus)-Promotor, der TK (Thymidinkinase)-Promotor, der EFl α (Elongationsfaktor-1-alpha)-Promotor, der SV40 (Simian Virus)-Promotor,
- 30 der RSV (Rous Sarcoma Virus)-Promotor und der pUB (Ubiquitin)-Promotor.

- 20 -

- Beispiele für regulierbare Elemente, die zell- bzw. gewebespezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in bestimmten Zelltypen exprimiert werden. Derartige Promotoren der sind beispielsweise der Insulin-Promotor für Beta-Zellen des Pankreas, der Sox-2-Promotor für Nervenzellen, der Albuminpromotor für Leberzellen, der Myosin-Schwere-Kette-Promotor für Muskelzellen, der VE-Cadherin-Promotor für Endothelzellen und der Keratinpromotor für Epithelzellen.
- Weitere Beispiele für regulierbare Elemente, die eine regulierbare Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind RU486 induzierbare Promotoren und der Tetracyclinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen M. et al., (1994) Curr. Opin. Biotechnol. 5, 516-20).
- Ebenfalls kann die Expression über regulative Nukleotidsequenzen, die Expression mengenmäßig und/oder zeitabhängig beeinflussen, gesteuert werden. Hierzu zählen beispielsweise Enhancersequenzen, Leadersequenzen, Polyadenylierungssequenzen, IRES-Sequenzen und Introns.
- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein *in vitro*-Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans, welches die folgenden Schritte enthält:
- a. Einbringen in mindestens eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans zum einen mindestens eine Nukleinsäure kodierend für ein Fusionsprotein und/oder mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein E₈-Fragment enthält, und zum anderen mindestens eine geeignete Differenzierungs-Markergen.

- 21 -

- b. Differenzierung der Zelle aus Schritt a.,
c. Selektionieren der differenzierten Zelle aus Schritt b. und
d. Einbringen der selektionierten Zelle aus Schritt c. in mindestens ein humanes
oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder in mindestens ein humanes
oder tierisches Säugetierorgan.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird in dem vorangehend beschriebenen
erfindungsgemäßen Verfahren nach, vor oder gleichzeitig mit Schritt a. mindes-
tens ein geeigneten Transfektions-Markergen eingebracht und nach Schritt a. vor-
zugsweise die transfektierte Zelle aus Schritt a. selektioniert.

Geeignete Bedingungen für die Differenzierung der Zellen können beispielsweise
durch Zugabe von Wachstumsfaktoren, welche die gewünschte Zelldifferenzie-
rung einleiten, geschaffen werden.

Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren zur Selektionierung von Zellen be-
kannt.

Zur Selektion der differenzierten Zellen von anderen Zellen enthält das erfin-
dungsgemäße Verfahren bevorzugt ein positives Selektionsschema. Hierbei wird
ein Markergen, beispielsweise ein Gen, welches eine Antibiotika-Resistenz über-
trägt, vor, während oder nach dem Differenzierungsschritt in Zelle eingebracht
und unter geeigneten Bedingungen zur Expression gebracht. Derartige Bedingun-
gen können beispielsweise darin bestehen, dass die Expression des Markergens
unter der Kontrolle eines Promotors steht, der nur in den gewünschten Zellen ak-
tiv ist.

Durch die Expression des Markergens wird den erfolgreich differenzierten Zellen
eine Resistenz für das Antibiotikum übertragen. Die der Differenzierung nachfol-
gende Selektion der Zellen kann daher beispielsweise leicht durch Inkontaktbrin-
gen der Zellen mit dem entsprechenden Antibiotikum erfolgen. Zellen, welche die

entsprechende Antibiotika-Resistenz nicht enthalten, sterben ab, so dass lediglich die differenzierten Zellen überleben. Das Inkontaktbringen im Sinne dieser Erfindung kann beispielsweise durch Zugabe der Wirksubstanzen in das Nährmedium einer Zellkultur erfolgen.

5 Unter einem erfindungsgemäßen Antibiotikum wird ein Antibiotikum verstanden, gegen welches das bzw. die erfindungsgemäße Selektionskassette verwendete(n) Antibiotikum-Resistenzge(n)e eine Resistenz erzeugen. Nach Hinzufügen des Antibiotikums zu den kultivierten Stammzellen überleben und differenzieren
10 im wesentlichen nur solche Stammzellen, die den Reporter-Gen-Expressionsvektor enthalten.

Bevorzugt wird ein zweites Markergen in die Zellen eingebracht, wodurch eine Selektion der Zellen, in denen das Einbringen der Nukleinsäure und/oder des Vektors gemäß Schritt a. des Verfahrens erfolgreich verlief, vorgenommen werden
15 kann. Durch diese doppelte Selektion ist es möglich, eine ca. 90%ig, vorzugsweise ca. 95-100%ig reine Zellpopulation der gewünschten Zellen zu erhalten.

Für derartige Selektionierungen können beispielsweise Differenzierungs-
20 Markergene und Transfektions-Markergene verwendet werden. Als solche werden überwiegend Gene verwendet, die eine Resistenz gegen bestimmte toxische Substanzen, beispielsweise Antibiotika, vermitteln, verwendet. Die häufigsten in diesem Zusammenhang verwendeten Antibiotika sind Neomycin, Hygromycin (hph), Zeocin (Sh ble) und Puromycin (pacA).

25 Weitere zur Selektionierung geeignete Gene, insbesondere zur Selektion von Stammzellen, sind beispielsweise Gene, die die Expression von Oberflächenmolekülen oder von Fluoreszenzmarkern, z.B. GFP, regulieren, mit deren Hilfe die zu selektierenden Zellen über Zell-Sortierung aufgereinigt werden können. Weitere
30 Beispiele sind Gene, die für eine Enzymaktivität kodieren, die einen Vorläufer einer toxischen Substanz, sog. "Prodrug" in eine toxische Substanz umwandeln. In

diesem Fall kann eine Negative Selektion erfolgen, d.h., es überleben nur die Zellen, die den dem Gen vorgeschalteten Promotor nicht exprimieren.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetieres, welches folgende Schritte enthält:

- a. Einbringen in mindestens eine Oocyte, eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines nicht-humanen Säugetieres einerseits mindestens eine Nukleinsäure, kodierend für ein Fusionsprotein und/oder mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, und andererseits mindestens ein geeignetes Transfektions-Markergen,
- b. Selektionieren der transfektierten Zelle aus Schritt a.,
- c. Einbringen der nach Schritt b. selektierten Zelle in mindestens eine nicht-humane Säugetier-Blastozyste,
- d. Einbringen der Blastozyste aus Schritt c. in eine nicht-humane, vorzugsweise scheinchwangere, Säugetier-Pflegemutter und
- e. Identifizierung des sich aus genannter Blastozyste entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers.

Die Verfahren zum Einbringen von Blastozyten sind dem Fachmann bekannt. Es kann beispielsweise durch Injektion erfolgen (Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F. und Lacy, E., A laboratory Manual (1994), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Die Identifizierung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass genomische DNA aus dem transgenen nicht-humanen Säugetier extrahiert wird, z.B. aus dem Schwanz einer Maus. In einer nachfolgenden PCR (Polymerase Chain Reaction) werden Primer verwendet, die spezifisch das Transgen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure erkennen. Eine Integration des Transgens kann auf diese Weise nachgewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Identifizierung kann mittels Southern Blot erfolgen. Hierbei wird genomische DNA auf eine Membran übertragen und mittels DNA-Sonden, beispielsweise radioaktiv markierte DNA-Sonden, die spezifisch für das gesuchte Transgen sind, detektiert.

Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugers durch Regenerieren einer nicht-humanen Stammzelle, Oocyte, Vorläuferzelle oder immortalisierten Zelle zu einem transgenen nicht-humanen Tier, insbesondere von transgenen Mäusen sind dem Fachmann aus der DE 196 25 049 und den US 4,736,866; US 5,425,122; US 5,698,765; US 5,583,278 und US 5,750,825 bekannt und umfassen transgene Tiere, die beispielsweise durch direkte Injektionen von erfindungsgemäßen Expressionsvektoren in Embryonen oder Spermatozyten oder über die Transfektion von Expressionsvektoren in embryonale Stammzellen erzeugt werden können (Polites und Pinkert: DNA Mikroinjection and Transgenic Animal Production, Seite 15-68 in Pinkert, 1994; Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press, San Diego, USA; Houdeline 1997, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands; Doetschman: Gene Transfer in Embryonic Stem Cells, Seite 115-146 in Pinkert, 1994, *supra*; Wood: Retrovirus-Mediated Gene Transfer, Seite 147-176 in Pinkert, 1994, *supra*; Monastersky: Gene Transfer Technology: Alternative Techniques and Applications, Seite 177-220 in Pinkert, 1994, *supra*).

25 Die Herstellung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers kann auch durch direkte Injektion einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure in den Pronukleus (Vorkern) eines nicht-humanen Säugetiers erfolgen.

Zahlreiche Verfahren zur Herstellung von transgenen Tieren, insbesondere von transgenen Mäusen, sind dem Fachmann ebenfalls u.a. aus der WO 98/36052, WO 01/32855, DE 196 25 049, US 4,736,866, US 5,625,122, US 5,698,765, US 5,583,278 und US 5,750,825 bekannt und umfassen transgene Tiere, die bei-

- 25 -

spielsweise über direkte Injektion von erfindungsgemäßen Vektoren in Embryonen oder Spermatozyten oder über die Transfektion von Vektoren oder Nukleinsäuren in embryonale Stammzellen erzeugt werden können (Polites und Pinkert, in Pinkert, (1994) Transgenic animal technology, A Laboratory Handbook, Academic Press, London, UK, Seite 15 bis 68; Doetschman, in Pinkert, 1994, supra, Seite 115 bis 146).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein nach vorangehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erzeugtes transgenes nicht-humanes Säugetier sowie dessen Nachkommen.

In weiteren Ausführungsformen handelt es sich bei der Stammzelle, welche in dem genannten erfindungsgemäßen *in vitro*-Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans und in dem Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers verwendet wird, um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle.

Ein Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen zur Gewinnung einer Zelle, eines organspezifischen Gewebes und/oder eines Säugetierorgans für die Allo- und/oder Xenotransplantation.

Im Fall der Zelltransplantation kann diese beispielsweise mittels eines Implantations-Verfahrens oder mittels einer Katheter-Injektion-Methode durch die Blutgefäßwand erfolgen.

Unter Gewinnung im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Entnahme der/des genannten Zelle, Gewebes und/oder Organs aus dem Organismus eines erfin-

dingungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers zu verstehen. Entsprechende Methoden zur Entnahme sind dem Fachmann allgemein geläufig.

5 Ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers, eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen und/oder zur Identifizierung von toxischen Substanzen.

10 Eine solche Methode könnte zum Beispiel darin bestehen, Zellen der vorliegenden Erfindung auf eine 96-well Mikrotiter-Platte auszusäen, dann eine zu untersuchende pharmakologisch aktive oder toxische Substanz zuzugeben und anschließend mittels Zellzahlbestimmung zu analysieren, ob die Substanz einen vermehrten Tod der Zellen bewirkt hat.

15 Unter den Begriffen pharmakologisch aktiver Wirkstoff und toxische Substanz im Sinne der Erfindung sind all jene Moleküle, Verbindungen und/oder Zusammensetzungen und Substanzgemische zu verstehen, die unter geeigneten Bedingungen einen pharmakologischen bzw. toxischen Einfluss auf einzelne Zellen, einzelne
20 Gewebe, einzelne Organe oder den gesamten Organismus eines tierischen oder humanen Säugetiers ausüben. Mögliche pharmakologisch aktive Wirkstoffe und toxische Substanzen können einfache chemische (organische oder anorganische) Moleküle oder Verbindungen, Nukleinsäuren oder Analoga von Nukleinsäuren, anti-sense Sequenzen von Nukleinsäuren, Peptide, Proteine oder Komplexe und
25 Antikörper sein. Beispiele sind organische Moleküle, die aus Substanz-Bibliotheken stammen und die auf ihre pharmakologische bzw. toxische Aktivität hin untersucht werden.

30 Pharmakologisch aktive Wirkstoffe sind beispielsweise Wirkstoffe, die Einfluss aus üben auf:

- 27 -

die Teilungs- und/oder Überlebensfähigkeit von Zellen,
die Sekretion von Proteinen z.B. Insulin von Beta-Zellen des Pankreas, Dopamin von Nervenzellen,
die Muskelzellen-Kontraktion und/oder
das Wanderungsverhalten von Zellen.

In Anwendung auf den gesamten Organismus eines tierischen oder humanen Säugetiers ist hierunter ein Einfluss auf beispielsweise

das Herz-Kreislaufsystem,
das Nervensystem sowie
die Stoffwechselaktivitäten
zu verstehen.

Toxische Substanzen sind beispielsweise Wirkstoffe, die
Zellen nach bestimmten Signalen, beispielsweise Stress, zur Apoptose anregen.

das Herz-Kreislaufsystem beeinflussen,
das Nervensystem beeinflussen und/oder
die Stoffwechselaktivitäten beeinflussen.

Die identifizierten pharmakologisch aktiven Wirkstoffe und toxischen Substanzen können gegebenenfalls kombiniert oder zusammen mit geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen zur Herstellung eines Diagnostikums oder eines Arzneimittels zur Diagnose, Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen, wie vorangehend beispielhaft aufgeführt, verwendet werden.

Figuren

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die vorliegende Erfindung verdeutlichen ohne sie jedoch zu beschränken.

- 28 -

- Fig. 1a ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz WT-IL-15-hIgG1,
 Fig. 1b ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz WT-IL-15-mIgG2a,
 Fig. 2a ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz WT-IL-15,
 5 Fig. 2b ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz hIgG1,
 Fig. 2c ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz mIgG2a,
 Fig. 3a ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz Igk8,
 Fig. 3b ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz 149-Fc
 Fig. 4 ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz WT-IL-15-hIgG1,
 10 Fig. 5 ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz WT-IL-15-mIgG2a,
 Fig. 6a ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz WT-IL-15,
 Fig. 6b ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz hIgG1,
 Fig. 7 ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz mIgG2a,
 Fig. 8a ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz muriner IgK-Leader,
 15 Fig. 8b ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz humaner CD5-Leader,
 Fig. 8c ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz humaner CD4-Leader,
 Fig. 8d ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz humaner IL-2-Leader,
 Fig. 9a ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz humaner MCP-Leader,
 Fig. 9b ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz des kurzen nativen humanen
 20 IL-15-Leaders,
 Fig. 9c ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz des langen nativen humanen
 IL-15-Leaders,
 Fig. 10 ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz Igk8,
 Fig. 11 ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz 149-Fc,
 25 Fig. 12 ist eine Abbildung der inhibierenden bzw. proliferationsfördernden Wirkung unterschiedlicher Protein-Konstrukte auf die IL-15 vermittelte Proliferation von CTLL-2 Zellen.

Erläuterung: hIgG1 steht für humanes IgG1 und mIgG2a steht für murines IgG2a.

Beispiele

Reagenzien

Reagenzien wie Zellkulturmedien, Enzyme, etc. wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei Invitrogen (vormals Gibco BRL/Life Technologies), Paisley, UK, bezogen, Laborchemikalien bei Roth (Karlsruhe).

Beispiel 1: Austausch der Signalsequenz

Aus der Arbeitsgruppe von T. Strom (Boston, USA) wurde ein Plasmid erhalten, das im Vektor pSecTagA (Invitrogen, Paisley, UK) die cDNA eines Fusionsproteins aus einem mutierten humanen IL-15 und einem murinen IgG2a-Fc-Teil (Hinge-C2-C3, Kim et al. 1998) enthält. Die Fusion von IL-15 mit dem Fc-Teil erfolgte über eine BamHI-Schnittstelle wodurch am Übergang eine zusätzliche Aminosäure (Aspartat) eingefügt wurde.

Im IL-15 waren an den Positionen 149 und 156 (entspricht den Positionen 101 und 108 nach Abspalten der Signalsequenz) zwei Glutaminreste zu Aspartat mutiert worden um eine Bindung des Proteins an die alpha-Untereinheit des IL-15 Rezeptors zu ermöglichen, jedoch die Signaltransduktion über die beta- und gamma-Untereinheit zu verhindern. Vom humanen IL-15 war die native, wenig effiziente Signalsequenz entfernt worden und entsprechend die trunkierte cDNA über die Schnittstellen HindIII und XbaI in den pSecTagA-Vektor kloniert worden, so dass der im Plasmid vorliegende Ig-kappa-Leader als Sekretionssignal genutzt werden konnte. Zwischen dem im Plasmid vorliegenden Ig-kappa-Leader und dem Beginn der IL-15-Sequenz lagen klonierungsbedingt 10 zusätzliche Aminosäuren vor. Um diese zu entfernen und um möglicherweise die Sekretion des Proteins zu verbessern, wurde der Ig-kappa-Leader gegen Signalsequenzen verschiedener anderer Proteine ausgetauscht. Dabei kann neben dem ursprünglichen Ig-kappa-Leader bei dem nur die zusätzlichen Aminosäuren entfernt wurden, al-

alternativ die Leadersequenzen von humanem IL-2, MCP-1, CD4 und CD5 einkloniert werden.

Beispiel 2: Vorbereitung des pSecTagA-Plasmids

5 Da die Klonierung der Signalsequenz über eine singuläre NheI-Schnittstelle, welche in 5'-Richtung des ATG-Startcodons der Leadersequenz liegt, und eine im 5'-Bereich der IL-15-Sequenz liegende BglII-Schnittstelle erfolgen sollte, wurde zunächst eine weitere BglII-Schnittstelle aus dem Vektor pSecTagA entfernt. Da-
 10 zu wurde der Vektor pSecTagA ohne Insert mit BglII geschnitten (Ansatz: 9 µg DNA, 4 µl 10x Puffer 2, 26 µl Wasser, 4 µl BglII (40 Units) in insgesamt 40 µl, Inkubation für 2 h bei 37°C).

Die DNA wurde über eine Pharmacia S400 Microspin-Säule (Amersham-
 15 Pharmacia, Freiburg) von Enzymen und Puffer gereinigt. 40 µl des Ansatzes wurden mit 5 µl 10x PCR-Puffer (Taq-Core-Kit, Qiagen, Hilden), 2 µl dNTPs (10 mM each, Taq-Core-Kit, Qiagen), 2 µl Wasser und 1 µl (4 Units) DNA Polymerase I (Klenow Fragment) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert um die BglII-Schnittstelle aufzufüllen. Anschließend wurde das Plasmid auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und die Bande mit Hilfe des Concert Rapid-Gel-Extraction Systems
 20 aus dem Gel eluiert. Der gesamte Ansatz wurde in 100 µl Wasser aufgenommen. 7,5 µl davon wurden zusammen mit 7,5 µl Wasser, 4 µl 5x T4-Ligase-Puffer und 1 µl T4-Ligase (1U) für 1h bei Raumtemperatur ligiert. Die Hälfte des Ligationssatzes wurde nach den Angaben des Herstellers in E.coli XL1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert.

25 In das so entstandene Plasmid wurde das gesamte Insert des oben genannten Plasmids: Ig-kappa Leader + 10 zusätzliche Aminosäuren-mutIL-15-mIgG2a über die Schnittstellen NheI und XbaI wieder einkloniert. Anschließend wurde der ursprüngliche Ig-kappa Leader + 10 Aminosäuren + 5'-IL-15 Teil über einen

- 31 -

NheI/BglII-Schnitt entfernt und durch eine Oligonukleotidklonierung durch die oben genannten Signalsequenzen ersetzt.

Beispiel 3: Klonierung des Ig-kappa-Leaders

- 5 Das Fragment lautete wie folgt: 5'-NheI-Leader-II-15-3' mit einer BglII Schnittstelle im 5'-Abschnitt des II-15. Da dieses Fragment zu lang war, um durch ein einziges Oligonukleotid abgedeckt zu werden, wurden zwei überlappende Oligos und deren komplementäre Stränge (insgesamt 4 Oligonukleotide) bei MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen (Sequenz der Oligonukleotide s.u.). Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden so gewählt, dass bereits überhängende Enden zum
- 10 Klonieren in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen (NheI, BglII) vorlagen. Die Oligonukleotide wurden zunächst phosphoryliert. Dazu wurden 10 µg jedes Oligos in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl 10x Forward-Puffer und 1 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U) für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden ä-
- 15 quimolare Mengen von jeweils Strang- und Gegenstrang-Oligo durch Erhitzen auf 95°C und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur annealt. Vor dem Klonieren in den Vektor wurden die doppelsträngigen Oligonukleotide über Nacht ligiert. Es wurden jeweils 5 µl der 5'- und 3'- doppelsträngigen Oligos + 4 µl 5x T4-Ligase-Puffer + 5 µl Wasser + 1 µl T4-Ligase (1 U) über Nacht bei 4°C inkubiert. An-
- 20 schließend wurde der Ligationsansatz auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und Oligodimere mit Hilfe des Concert Rapid-Gel-Extraction Systems aus dem Gel eluiert und im Endvolumen von 40 µl aufgenommen. Die Oligodimere wurden dann in die Klonierung eingesetzt: Es wurde über Nacht bei 12°C ligiert (10 µl Oligodimer, 4 µl 5x T4-Ligase-Puffer, 4 µl Wasser, 1 µl NheI/BglII geschnittenes
- 25 Plasmid, 1 µl T4-Ligase (1 U)). Von einem 20 µl -Ligationsansatz wurden 5 µl in die Transformation von E.coli XL10-Gold (Stratagene, nach Anleitung des Herstellers) eingesetzt.

30 Sequenzen der Ig-kappa-Oligonukleotide:

- 32 -

5'- Ig-kappa fwd

ctagccaccatggagacagacacactcctctatgggtactgctgctctgggtccaggtccactggtgacaa

komplementär Ig-kappa rev:

5 ccagtgtcaccagtggaaacctggaacccagagcagcagttacccatagcaggagtgtgtctgtctccatgggtgg

zweites Forward Oligo 3'-IL-15 fwd1.1:

ctgggtgaatgtaataagtattgaaaaaattga

10 komplementär IL-15 rev1.1

gatcttcaatttttcaaacacttattacattcat

Nach Annealing und Ligation ergibt sich das folgende Fragment:

5'-NheI-Ig-kappa-Leader-IL-15-BglII-3' mit der Sequenz (doppelsträngig)

15 5' - CTAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGG
TCCAGGTTCCACTGGTGACAACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTGAAAAAAAT
 TGAA-3'

komplementär:

20 3' - GGTGGTACCTCTGTCTGTGGAGGAGCATACCCATGACGACGAGACCCAAAGG
 TCCAGGTGACCACTGAAGACCACTTACATTATTCACTAAACTTTTTTTAACTT
 CTAG-5'

Erläuterung:

25 kursiv+unterstrichen: Schnittstellen NheIII bzw. BglII; fett gedruckt: Ig-kappa-Leader.

Die erhaltenen Klone wurden in der Miniprep (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden): auf ihr Restriktionsmuster hin untersucht. Dazu wurde ein Dreifachverdau

- 33 -

mit NheI/BglII (Restriktionsenzyme, die direkt den eingesetzten Leader wieder ausschneiden) und XbaI (schneidet 3' des Fc-Teils) durchgeführt.

Die DNA positiven Klone wurde über den Qiagen-Endofree-Maxi-Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert und bei GATC (Konstanz) sequenziert. Das so entstandene Plasmid (mutIL-15 101/108)-mIgG2a mit bereinigtem Ig-kappa-Leader wurde Igk8 genannt.

Genauso wie für das beschriebene Ig-kappa-Konstrukt wurde auch für die anderen Leader verfahren.

10 Beispiel 4 Herstellung der Konstrukte: WT-Fc und 149-Fc:

Ausgehend vom oben beschriebenen Plasmid Igk8 wurde mittels PCR mit Hilfe eines Forward-Primers mit BglII-Schnittstelle am 5'-Ende (IL-15fw3.1: 5'-atgaagatcttaacaatctatgc-3') und entsprechender 3'-Reverse-Primer (WT: 5'-ggatccgaagtgtgatgaacatttggacaatatgtacaaaactctgcaaaaattc-3'), (149: 5'-ggatccgaagtgtgatgaacatttggga-3') die Einzelmutanten hergestellt.

Als Template für die PCR-Reaktion wurden pro 25 µl-Ansatz 10 ng mutIL-15(101, 108)-murin Fc-Plasmid sowie jeweils 25 pmole Primer, 0,5 µl dNTPs (Taq-Core-Kit, Qiagen) und 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 0,9 U Taq Polymerase (Expand High-Fidelity-System, Roche, Mannheim) eingesetzt. Die DNA wurde in 30 Zyklen unter den Bedingungen: 45 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 60 Sekunden Annealing bei 60 °C und 45 Sekunden Synthese bei 72°C amplifiziert, anschließend über ein Agarose-Gel aufgereinigt, die PCR-Bande aus dem Gel eluiert und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. 25 µl des Ansatzes wurden mit 3 µl 10xPuffer 3 und jeweils 15 U BamHI und BglII versetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde über eine Pharmacia Microspin S400 Säule aufgereinigt. Aus dem Plasmid Igk8 wurde der IL-15-Anteil mit Doppelmutation ebenfalls durch einen Doppelverdau BglII/BamHI ausgeschnitten und durch den IL-15-Teil mit Einzelmutation oder Wildtypsequenz ersetzt. Die Identität der Plasmide wurde durch Sequenzierung verifiziert.

- 34 -

Beispiel 5: Herstellung von Protein:

Durch transiente Transfektion von HEK293-Zellen (ATCC, Manassas, USA) wurden die Proteine der Einzelmutanten hergestellt: Dazu wurden pro 150cm² Platte 60 µl Lipofectamin2000 in 2 ml Optimum 1-Medium- und 30 µg Plasmid-DNA (IgK λ , WT-Fc, 149-Fc) ebenfalls in 2 ml Optimum 1-Medium verdünnt. Die beiden Lösungen wurden gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das DNA/Liposomen-Gemisch auf zu ca. 80% konfluente 150cm² HEK-293-Platten ins Zellkulturmedium (Dulbecco's MEM+Glutamax+ 10%FCS+1% Pen/Strep) gegeben. Nach einem Tag wurde ein Mediumwechsel gegen Ultraculture-Medium (Biowhittaker, Verviers, Belgien) durchgeführt und anschließend das Zellkulturmedium für 4 Tage auf den Zellen belassen. Der Zellkulturüberstand wurde gesammelt, über einen Faltenfilter (Schleicher und Schüll, Dassel) gegeben um die groben Zellbestandteile zu entfernen, dann über einen 2 µm-Bottle Top-Filter (Nalgene-Nunc, Wiesbaden) sterilfiltriert und das IL-15-Fc-Fusionsprotein mittels Aufreinigung über Protein-A-Sepharose isoliert. Dazu wurden pro Liter Zellkulturüberstand 0,4 ml in Waschpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,5, 130 mM NaCl) gequollene Protein A-Sepharose (Amersham-Pharmacia, 50% v/v in Waschpuffer) zugegeben und der Ansatz bei 4°C über Nacht in einem Überkopfschüttler geschüttelt. Die ProteinA-Sepharose wurde in einer leeren Chromatographie-Säule aufgefangen und mit mindestens 150 ml Waschpuffer gewaschen. Das Protein wurde von der Säule mit 0,1 M Glycin pH 2,5 in 1 ml Fraktionen eluiert und sofort mit 60 µl 1M Tris/HCl, pH 9,5 neutralisiert. Das Protein wurde gegen PBS-Puffer dialysiert und sterilfiltriert. Im BCA-Assay (Pierce, Rockford, USA) wurde die Konzentration des Proteins bestimmt und mittels Silbergel und Western Blot (Erstantikörper: monoklonaler Maus anti-human IL-15, BD Biosciences Pharmingen, San Diego USA, Zweitantikörper: POD-Goat anti Maus, Dianova, Hamburg) Reinheit und Identität überprüft. Anschließend wurde die Funktionalität des Proteins im Proliferationsassay untersucht.

- 35 -

Beispiel 6: Proliferationsassay:

CTLL-2 Zellen (ATCC) sind murine cytotoxische T-Zellen, deren Proliferation abhängig von IL-15 oder IL-2, ist und die daher als Indikatoren für die proliferationsinhibierende Wirkung antagonistischer Proteine dienen können. Die Zellen wurden in einem Medium kultiviert, das aus RPMI 1640-Medium + 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) + 1% Pen/Strep + 20% Rat T-Stim with ConA (Becton Dickinson Labware, Bedford, USA), einem Gemisch verschiedener Wachstumsfaktoren, besteht.

- 10 Für das Ansetzen eines Proliferationsassays wurden die Zellen von restlichen, für die Kultur der Zellen nötigen Wachstumsfaktoren befreit, indem sie zweimal mit Zellkulturmedium (RPMI 1640+10%FCS+1%Pen/Strep) gewaschen und dann auch in diesem Medium aufgenommen wurden. Dazu wurden die Zellen bei 349g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wieder in
15 Zellkulturmedium aufgenommen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt.

- Der Assay erfolgte in Flachboden 96 well-Platten und es wurden pro well 150 µl Medium mit 3×10^5 Zellen/well eingesetzt. Für die Negativkontrolle erhielten die Zellen nur Medium mit 10% FCS, ohne zusätzliche Faktoren. Die Positivkontrolle enthält zusätzlich rekombinantes humanes IL-15 (R&D Systems, Minneapolis, USA) in einer eine halbmaximale Proliferation der Zellen zulassenden Konzentration (z.B. 12,5 pg/well). Negativ- und Positivkontrolle wurden jeweils in 6-fach-Ansätzen pipettiert.

- Zur Bestimmung der proliferationsinhibierenden Wirkung der oben genannten neuen IL-15-Fc Varianten wurden die Zellen wie für die Positivkontrolle beschrieben mit rekombinantem IL-15 versetzt und erhielten zusätzlich gereinigtes Protein der Doppelmutante 101/108 ausgehend von Igk8, des Wildtyp-Proteins (WT-Fc) oder der Einzelmutante (149-Fc). Es wurde dabei als höchste Konzentration 2 µg pro well eingesetzt und weiter jeweils 1:2 Verdünnungen (1 µg, 0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg, etc.). Zur Kontrolle wurden in denselben Konzentrationen die

- 36 -

folgenden verwandten Proteine eingesetzt: als unspezifischer Antikörper wurde mIgG2a (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) eingesetzt, zudem wurde IL-2-Fc, das einen nicht-mutierten Cytokin-Anteil enthält und somit die Proliferation der Zellen stimulieren sollte sowie CTLA4-Fc eingesetzt, ebenfalls ein strukturell verwandtes Fusionsprotein, das jedoch die Proliferation nicht beeinflussen sollte. Beide letztgenannten Proteine wurden bei Chimerigen (Allston, USA) bezogen. Alle Ansätze wurden in Triplikaten pipettiert.

Die Zellen wurden für 44 ± 2 Stunden bei 37°C im CO_2 -Brutschrank inkubiert und anschließend wurde die Proliferation mit Hilfe des XTT-Cell Proliferation Kits (Roche) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Dazu wurden die beiden Komponenten des Kits im Verhältnis 1:50 gemischt (d.h., $75 \mu\text{l}$ XTT-Labelling-Reagenz + $1,5 \mu\text{l}$ Electron Coupling Reagenz). Pro well wurden $75 \mu\text{l}$ der Mischung zugegeben und die Platte nach einer Inkubation für 4 Stunden bei 37°C im CO_2 -Inkubator im ELISA-Reader bei 490 gegen 690 nm gemessen.

Das Ergebnis ist in Figur 23 dargestellt:

WT-Fc, 149-Fc und Protein der Doppelmutante 101/108 (Plasmid Igk8) zeigen eine inhibierende Wirkung auf die IL-15 vermittelte Proliferation von CTLL-2 Zellen. IL-2-Fc und IgG2a zeigen eine eher proliferationsfördernde Wirkung.

Neg: die Zellen wurden ohne rekombinantes humanes IL-15 kultiviert.

Pos: die Zellen erhielten $12,5 \text{ pg/well}$ rekombinantes humanes IL-15.

Alle Zellen der weiteren Ansätze erhielten $12,5 \text{ pg/well}$ rekombinantes humanes IL-15 + das angegebene Protein in den Konzentrationen (von links nach rechts): $2 \mu\text{g}$, $1 \mu\text{g}$, $0,5 \mu\text{g}$, $0,25 \mu\text{g}$, $0,125 \mu\text{g}$, $0,0625 \mu\text{g}$. CTLA4-Fc zeigte keine Wirkung, alle Werte lagen im Bereich der Positivkontrolle (Daten nicht gezeigt).

- 37 -

Patentansprüche

1. Fusionsprotein aus einem Wildtyp-IL-15 und einem IgG-Fc-Fragment, mit
Ausnahme eines murinen IgG2b-Fc-Fragments.
2. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das IgG-Fc-Fragment ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4 ist.
3. Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 enthaltend die Aminosäuresequenz
SEQ ID NO:1. (Seq.WT-IL-15)
4. Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 enthaltend die Aminosäuresequenz
SEQ ID NO:2. (Seq.IgG1)
5. Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 enthaltend die Aminosäuresequenz
SEQ ID NO:3. (Seq.IgG2a)
6. Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 enthaltend die Aminosäuresequenz
SEQ ID NO:4. (gesamt: Seq.WT-IL-15 + IgG1)
7. Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 enthaltend die Aminosäuresequenz
SEQ ID NO:5. (gesamt: Seq.WT-IL-15 + IgG2a)
8. Nukleinsäure kodierend für ein Fusionsprotein nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7.
9. Nukleinsäure nach Anspruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:6.
(Seq.WT-IL-15)

- 38 -

10. Nukleinsäure nach Anspruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:7.
(Seq.IgG1)
11. Nukleinsäure nach Anspruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:8.
(Seq.IgG2a)
12. Nukleinsäure nach Anspruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:9.
(gesamt Seq.WT-IL-15 + IgG1)
13. Nukleinsäure nach Anspruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:10.
(gesamt Seq.WT-IL-15 + IgG2a)
14. Vektor enthaltend mindestens eine Nukleinsäure nach mindestens einem der Ansprüche 8 bis 13.
15. Zelle enthaltend mindestens eine Nukleinsäure nach mindestens einem der Ansprüche 8 bis 13 und/oder mindestens einen Vektor nach Anspruch 14.
16. Zelle nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Zelle um eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle handelt.
17. Zelle nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
18. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 15 bis 17 in Form einer Zelllinie.
19. Arzneimittel enthaltend mindestens ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 7, mindestens eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 8 bis 13, mindestens einen Vektor nach Anspruch 14 und/oder mindestens eine

- 39 -

Zelle nach einem der Ansprüche 15 bis 17 und geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.

- 5 20. Humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder humanes oder tierisches Säugetierorgan enthaltend mindestens ein Fusionsprotein, mindestens eine Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens eine Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält.
- 10 21. Transgenes nicht-humanes Säugetier enthaltend mindestens ein Fusionsprotein, mindestens eine Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens eine Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält.
- 15 22. Verwendung eines Fusionsproteins, einer Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, eines Vektors enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einer Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, oder eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 20 zur Inhibierung eines IL-15 vermittelten zellulären Ereignisses.
- 20 23. Verwendung eines Fusionsproteins, einer Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, eines Vektors enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einer Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein
- 25 30

- 40 -

Wildtyp IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, oder eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 20, zur Inhibierung der Interaktion eines IL-15 mit seinem Rezeptor.

5

24. Verwendung eines Fusionsproteins, einer Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, eines Vektors enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einer Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, zur Lyse von Zellen, die einen IL-15-Rezeptor exprimieren.

10

25. Verwendung eines Fusionsproteins, einer Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, eines Vektors enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einer Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, oder eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 20, zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen.

15

20

26. Verwendung eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 20 zur Transplantation in ein humanes oder tierisches Säugetier.

25

27. Verwendung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Auto-, Allo- oder Xenotransplantation handelt.

30

28. Verfahren zur Herstellung eines Fusionsproteins nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 enthaltend folgende Schritte:

- 41 -

- a. Einbringen mindestens einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 8 bis 13 und/oder mindestens eines Vektors nach Anspruch 14 in eine Zelle, und
- b. Expression der Nukleinsäure unter geeigneten Bedingungen.

5 29. *In vitro*-Verfahren zur Herstellung eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 20 enthaltend die folgenden Schritte:

- a. Einbringen in mindestens eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder humanen oder tierischen Säugetierorgans zum
10 einbringen mindestens eine Nukleinsäure kodierend für ein Fusionsprotein und/oder mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fe-Fragment enthält, und zum anderen mindestens ein geeignetes Differenzierungs-Markergen,
15
- b. Differenzierung der Zelle aus Schritt a.,
- c. Selektionieren der differenzierten Zelle aus Schritt b. und
- d. Einbringen der selektionierten Zelle aus Schritt c. in ein humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder in ein humanes oder tierisches Säugetierorgan.
20

30. Verfahren nach Anspruch 29; dadurch gekennzeichnet, dass nach, vor oder gleichzeitig mit Schritt a. mindestens ein geeigneten Transfektions-Markergen eingebracht wird und nach Schritt a. vorzugsweise die transfektierte Zelle aus
25 Schritt a. selektioniert wird.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
30

- 42 -

32. Verfahren zur Erzeugung transgener nicht-humaner Säugetiere nach Anspruch 21 enthaltend folgende Schritte:

- a. Einbringen in mindestens eine Oocyte, eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines nicht-humanen Säugetieres einwärts mindestens eine Nukleinsäure, kodierend für ein Fusionsprotein und/oder mindestens einen Vektor, enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, und andererseits mindestens ein geeignetes Transfektions-Markergen,
- b. Selektionieren der transfektierten Zelle aus Schritt a.,
- c. Einbringen der nach Schritt b. selektierten Zelle in mindestens eine nicht-humane Säugetier-Blastozyste,
- d. Einbringen der Blastozyste aus Schritt c. in eine nicht-humane Säugetier-Pflegemutter und
- e. Identifizierung des sich aus genannter Blastozyste entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers.

33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.

34. Transgenes nicht-humanes Säugetier, dadurch gekennzeichnet, dass es nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 32 oder 33 erzeugt wurde.

35. Transgenes nicht-humanes Säugetier, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Nachkomme des Säugetieres nach Anspruch 34 ist.

36. Verwendung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach mindestens einem der Ansprüche 21, 34 oder 35 zur Gewinnung einer Zelle, eines organspezifischen Gewebes und/oder eines Säugetierorgans für die Allo- und/oder Xenotransplantation.

37. Verwendung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach einem der Ansprüche 21, 34 oder 35, eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 20 zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen und/oder zur Identifizierung von toxischen Substanzen.

- 44 -

1/12

5 Figur 1 a:

Aminosäuresequenz WT-IL-15-bIgG1:

NWVNVISDLKKTEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESG
DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMF
10 INTSDPKSADKTHTCPPCPAEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKLEAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

15

Figur 1 b:

Aminosäuresequenz WT-IL-15-mIgG2a:

20 NWVNVISDLKKTEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESG
DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMF
INTSDPRGETIKPCPPCKCPAENLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVD
VSEDDPDVQISWFFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFK
CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDPMPE
25 DIYVEWTNNKTELNKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSQSVVHE
GLNNHHTTSSFSRTPGK

44

- 45 -

2/12

5 Figur 2 a:

Aminosäuresequenz WT-IL-15:

NWVNVISDIKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESG
DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMF
10 INTS

Figur 2 b:

Aminosäuresequenz hlgG1:

15

PKSADKTHLCPPOPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDSEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
20 TQKSLSLSPK

Figur 2 c:

Aminosäuresequenz mlgG2a:

25

PRGPTIKPQIPCKQPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSISPIVTCVVVDVSEDD
PDVQISWFWANVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNN
KDLPAPIEFQISKKGSVRAPOVYVLPPEEEMTKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE
WTNNGKTELNYKNTPEVLDSGGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNH
30 HTTKSFSRTESK

- 46 -

3/12

5 Figur 3 a:

Aminosäuresequenz Igk8

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESG
DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLDSFVHIVDMF
10 INTSDPRGETIKECPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVD
VSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFK
CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTILTCMVTDPMPE
DIYVEWTNNCKTELNYKNTEFVLDSGSGYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE
GLHNHHTTKSFSRTPGK

15

Figur 3 b:

Aminosäuresequenz 149-Fc

20 NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESG
DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLDSFVHIVQMF
INTSDPRGETIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVD
VSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFK
CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTILTCMVTDPMPE
25 DIYVEWTNNCKTELNYKNTEFVLDSGSGYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE
GLHNHHTTKSFSRTPGK

- 47 -

4/12

5 Figur 4:

Nukleinsäuresequenz WT-IL-15-hIgG1:

AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTGAAAAAACCGAAGATCTTATTCAATCTA
TGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGTTGCAAAGT
10 AACAGCAATCAAGTGCTTTCTCTTGAGGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGA
GATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTT
TGTCTTCTAATGGGAATGTAAAGAATCTGGATGCAAGAATGTGAGGAAGTGGAA
GGAAAAAATATTAAAGAATTTTTCAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTT
ATCAACACATTCGGATCCCAAATCTGCTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCC
15 CAGCACCTGAACCTCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAA
GGACACCCCTATGATCTCCCGTACCCCTGAGGTCAAGTGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGC
ATAATGCCAAGACAAAGCCGCCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
CAGCGTCTTACCGTCTTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
20 AAGGTCTCCACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA
AAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCT
GACCAAGAAACAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC
ATCGCCGTGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGC
CTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA
25 CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATCTA
GA

- 48 -

S/12

5 Figur 5:

Nukleinsäuresequenz WT-IL-15-mIgG2a:

AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTA
TGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTCACCCCAGTTGCAAAGT
10 AACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGA
GATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTT
TGTCTTCTAATGGGAATGTAAAGAAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGA
GGAAAAAATATTAAGAATTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTT
ATCAACACCTCGGATCCCAGAGGGCCCAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAAT
15 GCCCAGCACTTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGAT
CAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTACATGTGTGGTGGTGGAT
GTGAGCGAGATGACCCAGATCTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAC
TACACACAGCTCAGACACAAACCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGT
GGTCAGTGGCCTCCCCATCCACACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAA
20 TGCAAGGTCAACAACAAGACCTCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAC
CCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAG
GATGACTAAGAAACAGGTCACCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAA
GACATTTACCTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACA
CTGAACCAGTCTGGACTCTGATGGTTCCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGT
25 GGAAAAGAGAACTGGGTGGAGAGAAATAGCTACTCCTGTTTCAAGTGGTCCACGAG
GGTCTGCACATCACCACAGCACTAAGAGCTTCTCCGGACTCCGGGTAATGAG

- 49 -

6/12

5 **Figur 6 a:**
Nukleinsäuresequenz WT-IL-15:

AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTA
TGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGTTGCAAAGT
10 AACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGA
GATGCAAGTATTGATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTT
TGTCTTCTAATGGGAATGTAAAGAAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGA
GGAAAAAATATTAAAGAATTTTTCAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTT
ATCAACACTTC

15 **Figur 6 b:**
Nukleinsäuresequenz hIgG1:

CCCAAATCTCTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC
20 TGGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACCTGGACGGCCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTTGGTCAGCGTCTCACCGT
CCTGCACCAAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
25 GCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGTTGACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACGTGCTGGTCAAGGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT
CAGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
30 GCAGGGGAAGCTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTTCCGGGTAAATGAT

- 50 -

7/12

5 **Figur 7:**

Nukleinsäuresequenz mlgG2a:

CCCAGAGGCCCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACC
TCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCAT
10 GATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGAC
CCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGA
CACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCC
CATCCAGCACCCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAAC
AAAGACCTCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAA
15 GAGCTCCAGAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACA
GGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAG
TGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGG
ACTCTGATGCTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTG
GGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCAC
20 CACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATGAG

50

- 51 -

8/12

5 Figur 8 a:
Nukleinsäuresequenz muriner IgK-Leader:

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCA
CTGGTGAC

10

Figur 8 b:
Nukleinsäuresequenz humaner CD5-Leader:

15 ATGCCCATGGGTCTCTGCAACCGCTGGCCACCTTGCTACCTGCTGGGGATGCTGG
TCGCTTCCTGCCTCGGA

Figur 8 c:
20 Nukleinsäuresequenz humaner CD4-Leader:

ATGAACCGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTCC
TCCCAGCAGCCACTCAGGGA

25

Figur 8 d:
Nukleinsäuresequenz humaner IL-2-Leader:

ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCACTTGCCTAAGTCTTGCACTTGTCACAA
30 ACAGT

15

- 52 -

9/12

5 Figur 9 a:
Nukleinsäuresequenz humaner MCP-Leader:

ATGAAAGTCTCTGCCGCCCTTCTGTGCCTGCTGCTCATAGCAGCCACCTTCATTC
CCCAAGGGCTCGCT

10

Figur 9 b:
Nukleinsäuresequenz des kurzen nativen humanen IL-15-Leaders:

15 ATGTCTTCATTTGGGCTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAA

Figur 9 c:
Nukleinsäuresequenz des langen nativen humanen IL-15-Leaders:

20

ATGAGAATTTGAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGCTACTTGTGTT
TACTTCTAAACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTGGCATTCATGTCTTCATTTTGGG
CTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAAACAGAAGCC

25

52

- 53 -

10/12

5 Figur 10:
Nukleinsäuresequenz Igk8

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCA
CTGGTGACAACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTGAAAAAATTGAAGATCTTAT
10 TCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAGTGATGTTACCCCAGT
TGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTG
AGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAA
CAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAG
GAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTGGACAGTTTGTACATATTGTCG
15 ACATGTTTCATCAACACTTCGGATCCCAGAGGGCCCAATCAAGCCCTGTCCCTC
ATGCAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCT
CCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCGCTGAGCCCATAGTCACATGTGTGG
TGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAA
CGTGGAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACT
20 CTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGG
AGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAGACCTCCAGCGCCCATCGAGAGAACCAT
CTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCA
GAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCA
TGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTA
25 CAAGAACACTGAACCACTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAG
CTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCACTGG
TCCACGAGGGTCTGCACAATCACACAGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGG
TAAATGAG

30

53

- 54 -

11/12

5 Figur 11:
Nukleinsäuresequenz 149-Fc

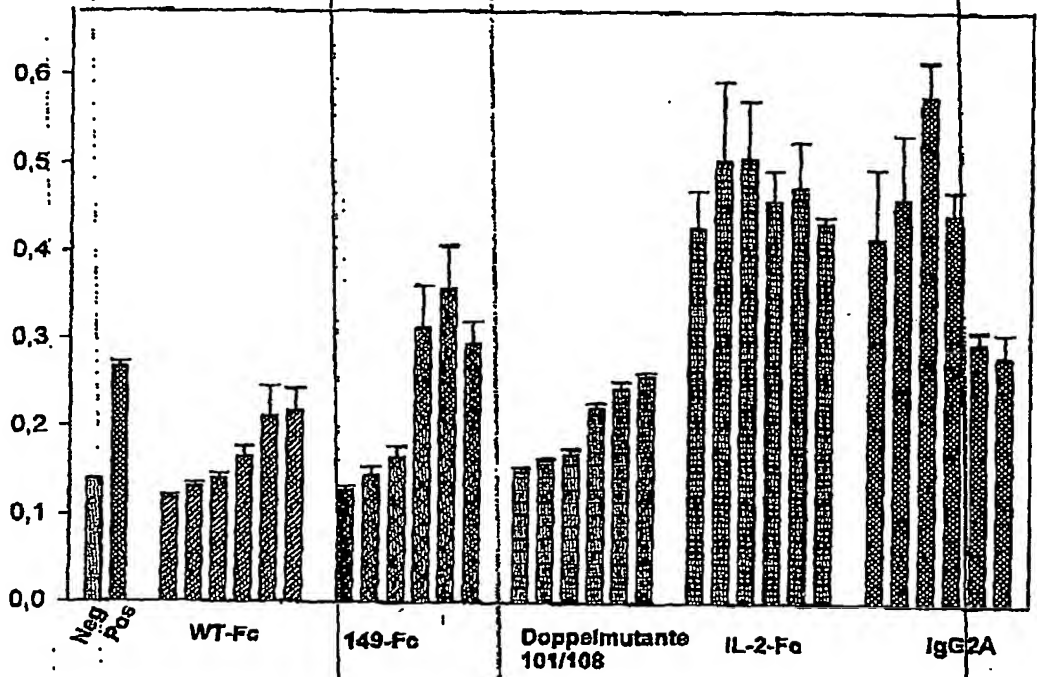
ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCA
CTGGTGACAACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTAT
10 TCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGT
TGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTG
AGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAA
CAACAGTTTCTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAG
GAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTGGACAGTTTTGTACATATTGTCC
15 AAATGTTTCAACAACACTTCGGATCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCC
ATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCT
CCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCGCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGG
TGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAA
CGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACT
20 CTCCGGGTGGTTCAGTGCCCTCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGG
AGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAGACCTCCAGCGCCCATCGAGAGAACCAT
CTCAAACGCAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCA
GAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCA
TGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAACAGAGCTAAACTA
25 CAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAG
CTGAGAGTGGAAGAAGAAGTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTTCAGTGG
TCCACGAGGGTCTGCACAATCACACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGG
TAAATGAG

Empfangszeit 14. Okt. 18:08

- 55 -

12/12

Figur 12:
Inhibierende bzw. proliferationsfördernde Wirkung unterschiedlicher Protein-Konstrukte auf die IL-15 vermittelte Proliferation von CTLL-2-Zellen:



55

10

SEQUENCE LISTING

<110> Cardion AG

<120> Interleukin-15 Antagonisten und ihre Verwendung zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolge- und/oder Autoimmunerkrankungen

<130> C36726

<160> 29

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 346

<212> ERT

<213> Artificial

<220>

<223> Fusion protein comprising WT-IL-15 and human IgG1

<400> 1

Asn	Trp	Val	Asn	Val	Ile	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Thr	Glu	Asp	Leu	Ile
1				5					10					15	

Gln	Ser	Met	His	Ile	Asp	Ala	Thr	Leu	Tyr	Thr	Glu	Ser	Asp	Val	His
			20					25					30		

Pro	Ser	Cys	Lys	Val	Thr	Ala	Met	Lys	Cys	Phe	Leu	Leu	Glu	Leu	Gln
		35					40						45		

Val	Ile	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Asp	Ala	Ser	Ile	His	Asp	Thr	Val	Glu
	50					55					60				

Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Val
65					70					75				80	

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 85 90 95
 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 100 105 110
 Thr Ser Asp Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 115 120 125
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 130 135 140
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 145 150 155 160
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 165 170 175
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 180 185 190
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 195 200 205
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 210 215 220
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 225 230 235 240
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 245 250 255
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 260 265 270
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 275 280 285
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 290 295 300
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 305 310 315 320
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 325 330 335

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340 345

<210> 2

<211> 347

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fusion protein comprising WT-IL-15 and murin IgG2a

<400> 2

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Thr Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110

Thr Ser Asp Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys
115 120 125

Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr
145 150 155 160

Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser
165 170 175

Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His
180 185 190

Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile
195 200 205

Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn
210 215 220

Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys
225 230 235 240

Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu
245 250 255

Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe
260 265 270

Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu
275 280 285

Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
290 295 300

Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg
305 310 315 320

Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His
325 330 335

Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
340 345

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110

Thr Ser

<210> 4

<211> 231

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
1 5 10 15

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 5

<211> 232

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 5

Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
20 25 30

Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val

50	55	60
Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala	Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp	
65	70	75
Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val	Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln	
	85	90
Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe	Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp	
	100	105
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr	Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val	
	115	120
Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu	Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr	
	130	135
Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys	Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu	
	145	150
Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn	Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr	
	155	160
Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr	
	165	170
Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys	Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr	
	175	180
Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly	Leu His Asn His His Thr Thr Lys	
	185	190
Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys		
	195	200
	205	
	210	
	215	
	220	
	225	
	230	

<210> 6

<211> 347

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Plasmid

<400> 6

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
85 90 95

Lys Glu Phe Leu Asp Ser Phe Val His Ile Val Asp Met Phe Ile Asn
100 105 110

Thr Ser Asp Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys
115 120 125

Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr
145 150 155 160

Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser
165 170 175

Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His
180 185 190

Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile
195 200 205

Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn
210 215 220

Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys
225 230 235 240

Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu

245	250	255
Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr 260	Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe 265	
Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu 275	Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu 280	285
Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro 290	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr 295	300
Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val 305	Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg 310	315 320
Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val 325	His Glu Gly Leu His Asn His His 330	335
Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr 340	Pro Gly Lys 345	
<210> 7		
<211> 347		
<212> ERT		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Fusion protein comprising	mutIL-15 and Fc-Fragment	
<400> 7		
Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp 1 5	Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile 10 15	
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr 20	Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His 25 30	
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met 35 40	Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln 45	
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala 50 55	Ser Ile His Asp Thr Val Glu 60	
Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser 65 70	Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val 75 80	

Thr	Glu	Ser	Gly	Cys	Lys	Glu	Cys	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ile	85	90	95
Lys	Glu	Phe	Leu	Asp	Ser	Phe	Val	His	Ile	Val	Gln	Met	Phe	Ile	Asn	100	105	110
Thr	Ser	Asp	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	115	120	125
Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	130	135	140
Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	145	150	155
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	165	170	175
Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	180	185	190
Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	195	200	205
Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	210	215	220
Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	225	230	235
Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	245	250	255
Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	260	265	270
Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	275	280	285
Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	290	295	300
Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	305	310	315
Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	320	325	330

	325	330	335	
Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr	Pro Gly Lys			
340	345			
<210> 8				
<211> 1047				
<212> DNA				
<213> Artificial				
<220>				
<223> Fusion protein comprising	WT-IL-15	and human IgG1		
<400> 8				
aactgggtga atgtaataag tgatttgaaa	aaaaccgaag atcttattoa atctatgcat	60		
atlgatgcta ctttatalac ggaaagtgat	gttcacccca gttgcaaagt aacagcaatg	120		
aagtgttttc tcttgaggtt acaagttatt	tcacttgagt cgggagatgc aagtattcat	180		
galacagtag aaalctgat catcctagca	aacaacagtt tgtcttctaa tgggaatgta	240		
acagaatctg gatgcaanga atgtgaggaa	ctggaggaaa aaaatattaa agaatttttg	300		
cagagttttg tacataatgt ccaaagtgtc	atcaaacactt cggatcccaa atctgctgac	360		
aaaactcaaa catgccacc gtgccagca	cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc	420		
ctctccccc caaaacccaa ggacaccctc	atgatctccc ggaccctga ggtcaagtgc	480		
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct	gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	540		
gtggaggtgc ataattgcaa gacaaagccg	cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	600		
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag	gaactggtga atggcaagga gtacaagtgc	660		
aaggtotcca acaaagccct ccagccccc	atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg	720		
cagcccccag aaccacagyt gtacaccctg	cccccatccc gggatgagct gaccaagaac	780		
caggtcagcg tgacctgct ggtcaaaggc	ctctatocca gcgacatcg cgtggagtgg	840		
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac	aagaccagc ctcctgtgct ggactccgac	900		
ggctccttct tctctacag caagctcacc	gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	960		
gtcttctcat gctccglgat geatgaggct	ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1020		
tccctgtctc cgggtaaatg atctaga		1047		
<210> 9				

<211> 1045

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Fusion protein comprising WT-IL-15 and murin IgG2a

<400> 9

```

aactgggtga atgtaataag tgatttgaaa aaaattgaag atcttattca atctatgcat      60
atlgatgcta ctttatatac ggaaagtga: gttcaccoca gttgcaaagt aacagcaatg      120
aaqtgctttc tcttggagtt acaagttatt tcacttgagt cgggagatgc aagtattcat      180
gatcacgtag aaaactgtgt catcctagca: aacaacagtt tgtcttctaa tgggaatgta      240
acagaatctg gatgaaanga atgtgaggaa ctggaggaaa aaaatattaa agaatttttg      300
cagagttttg tacatatlgt ccaaagtgtt atcaacactt cggatcccag agggcccaca      360
atcaagccct gtccaccatg caaatgccca gcacctaacb tcttgggtgg accatccgtc      420
ttcatcttcc ctccaaagat caaggatgta ctcatgatct ccctgagccc catagtcaca      480
tgltggttgg tggatgtgag cgaggatgac ccagatgtcc agatcagctg gtttgtgaac      540
aacytggaag tacacacagc tcagacacaa acccatagag aggattacaa cagtactctc      600
cgggtgggtca gtgccctccc catccagcac caggactgga tgagtggcaa ggagttcaaa      660
tgcaagggtca acaacaaaga cctcccagcg pccatcgaga gaaccatctc aaaacccaaa      720
gggtcagtaa gagctccaca ggtatatgtc ttgcctccac cagaagaaga gatgactaag      780
aaacagggtca ctctgacctg catggtcaca gacttcatgc ctgaagacat ttacgtggag      840
tggaaccaaca acgggnaaac agagetaaac tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct      900
gatggttctt acttcctgta cagcaagctg agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga      960
aatagctact cctgttcagt ggtccacgag ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc     1020
ttctcccgga ctccggglaa atgag                                           1045

```

<210> 10

<211> 341

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

aactgggtga atglaafag tgatttgaaa	aaaattgaag atcttattca atctatgcat	60
attgatgcta cttratatc ggaaagtgat	gttcaccca gttgcaaagt aacagcaatg	120
aagtgccttc tctiggagt acaagttatt	tcacttgagt ccggagatgc aagtattcat	180
gatacagtag aaantctgat catcctagca	aacaacagtt tgtcttctaa tgggaatgta	240
acagaatctg gatgcaaga atgtgaggaa	ctggaggaaa aaaatattaa agaatttttg	300
cagagtcttg tacataitgt ccaaatgttc	atcaacactt c	341

<210> 11

<211> 697

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

cccaaatctg ctgacaaac tcacacatgc	ccacogtgc cagcacctga actcctgggg	60
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa	cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc	120
cttgaggtca cgtgcgtgt ggtggacgtg	agccacgaag acctgaggt caagttcaac	180
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac	240
aacagcacgt accgtgtgt cagcgtcttc	acogtctgc accaggactg gctgaatggc	300
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa	gccctccag ccccatoga gaaaaccatc	360
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca	caggtgtaca ccctgcccc atcccggtat	420
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc	tgcttggtca aaggcttcta tccagcgac	480
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	ccggagaaca actacaagac cagcctccc	540
gtgctggact ccgacggc cttcttcttc	tcacgcaagg tcaccgtgga caagagcagg	600
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	gtgatgcatt aggtcttgca caaccactac	660
acgcagaaga gcctc cct gtctccgggt	aatgat	697

<210> 12

<211> 700

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 12

cccagagggc ccacaalcaa gccctgtcct	ccatgcaaat gcccagcaco taacctcttg	60
ggtggaccat ccgtcttcat cttccctcca	agatcaagg atgtactcat gatctccctg	120

agcccatag tcacatgtgt ggtggtggat gtgagcagg atgaccaga tgtccagatc	180
agctggtttg tgancuacgt ggaagtacac acagctcaga cacaaccca tagagaggat	240
tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc ctcccatcc agcaccagga ctggatgagt	300
ggcaaggagt tcaaatqcaa ggtcaacaac aaagacctc cagcgcccat cgagagaacc	360
atctcaaaac ccaaygggtc agtaagagct ccacagggtt atgtcttgcc tccaccagaa	420
gaagagatga ctaagaaaca ggtcactctg acctgcatgg tcacagactt catgcctgaa	480
gacatttacg tggagtggac caacaacggg aaaacagagc taaactacaa gaacactgaa	540
ccagtcctgg actctgatgg ttcttacttc atgtacagca agctgagagt ggaaaagaag	600
aactgggtgg aaagaanlag ctactcctgt tcagtggctc acgaggggtc gcacaatcac	660
cacacgaata agagcttctc ccggactccg ggtaaataag	700

<210> 13

<211> 63

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 13

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactgg	60
gac	63

<210> 14

<211> 72

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

atgcucatgg ggtctctgca accgctggcc acctgtacc tgctggggat gctggctgct	60
tcctgcctcg ga	72

<210> 15

<211> 75

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15'
 atgaaccggg gaglcccttt taggcacttg cttctgggtg tgcaactggc gctcctccca 60
 gcagccaetc aggga 75

<210> 16

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16
 atgracagga tgcaactcct gtcttgcatg gcactaagtc ttgcacttgt cacaaacagt 60

<210> 17

<211> 68

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17
 tgaaggtctc tgccgccttt ctgtgcctgc tgcctatagc agccaccttc attccccaag 60
 ggctcgct 68

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18
 atgtcttcac tttgggctgt ttcagtgcag ggcttcctaa 40

<210> 19

<211> 144

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

atgagaattt cgauacnaca ttgagaagt atttccatcc agtgctactt gtgtttactt	60
ctaaacagtc attttctaac tgaagctggc attcatgtct tcattttggg ctgtttcagt	120
gcagggcttc ctaaaacaga agcc	144

<210> 20

<211> 1108

<212> DNA

<213> Artificial

<220> .

<223> Plasmid

<400> 20

atggagacag acacactccc gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggc	60
gacaaactggg tgaatglaat aagtgatttg aaaaaattg aagatcttat tcaatctatg	120
catattgatg ctactttata tacggaaagt gatgttcacc ccagttgcaa agtaacagca	180
atgaagtgtt ttctcttggg gttacaagtt atttcaactg agtccggaga tgcaagtatt	240
catgatacag tagaaaatct gatcatccta gcaacaaca gtttgtcttc taatgggaat	300
gtaacagaat ctggatgcaa agaattgtgag gaactggagg aaaaaaatat taaagaattt	360
ttgyacagtt ttgtacatat tgtcgacatg ttcatcaaca cttcggatcc cagaggggccc	420
acaatcaagc cctgtcctcc atgcaaatgc ccagcaccta acctcttggg tggaccatcc	480
gtcttcatct tccctccaaa gatcaaggat gtactcatga tctccctgag ccccatagtc	540
acatgtgtgg tgggtggatgt gagcgaggat gaccagatg tccagatcag ctgggtttgtg	600
aacaacgtgg aagtacacac agctcagaca caaaccata gagaggatta caacagtact	660
ctccgggtgg tcaagtgcct ccccatccag caccaggact ggatgagtgg caaggagttc	720
aatgcaagg tcaacnaca agacctccca gcgcccatcg agagaaccat ctcaaaaccc	780
aaagggtcag taagaactcc acaggtatat gtottgcctc caccagaaga agagatgact	840
aagaaacagg tcaacttgac ctgcattggtc acagacttca tgcctgaaga catttacgtg	900
gagtggacca acaacgggna aacagagcta aactacaaga acactgaacc agtcctggac	960
tctgatgggt cttacttcat gtacagcaag ctgagagtgg aaaagaagaa ctgggtggaa	1020
agaaatagct actcctgttc agtgggtccac gagggtctgc acaatcacca caccgactaag	1080
agcttctccc ggactcggg taaatgag	1108

<210> 21

<211> 1108

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Fusion protein comprising mutIL-15 and Fc-Fragment

<400> 21

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt	60
gacaactggg tgaatgtaat aagtgatttg aaaaaaattg aagatcttat tcaatctatg	120
catattgatg ctactttota tacggaaagt gatgttcacc ccagttgcaa agtaacagca	180
atgaagtget ttctcttggg gttacaagtt atttcacttg agtccggaga tgceagtatt	240
catgatacag tagaaanlct gatcatccta gcaaacaaca gtttgtcttc taatgggaat	300
gtuacagaat ctgggtgcaa agaattgtgag gaactggagg aaaaaaatat taaagaattt	360
ttggacagtt ttgtacatat tgtccaaatg ttcatcaaca cttcggatcc cagagggccc	420
acaatcaagg cctgtctctc atgcaaattg ccagcaccta acctcttggg tggaccatcc	480
gtcttctatc tccctccnaa gatcaaggat gtactcatga tctccctgag ccccatagtc	540
acatgtgtgg tgggtgatgt gagcgaggat gaccagatg tccagatcag ctggttttgtg	600
aacaacgtgg aagtacacac agctcagaca caaaccata gagaggatta caacagtact	660
ctccgggtgg tcagtgcctt ccccatccag caccaggact ggatgagtgg caaggagttc	720
aaatgcaagg tcaacaacaa agacctccca gcgcccacg agagaaccat ctcaaaaccc	780
aaaagggtcag taagagctcc acaggtatat gtcttgcttc caccagaaga agagatgact	840
aagaaacagg tcactctgac ctgcatggtc acagaactca tgcctgaaga catttacgtg	900
gagtggacca acaacgggaa aacagagcta aactacaaga aactgaacc agtcctggac	960
tctgatgggt cttacttcat gtacagcaag ctgagagtgg aaaagaagaa ctgggtggaa	1020
agaatatgct actcctgttc agtgggtccac gaggggtctgc acaatcacca caggactaag	1080
agcttctccc ggactccggg taaatgag	1108

<210> 22

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide forward primer

<400> 22

ctagccacca tggagacaga cacactcctg ctatgggtac tgctgctctg ggttccaggt

60

tccactgggtg acaa

74

<210> 23

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide reverse primer

<400> 23

ccagtgtgtca ccagtgtgtac ctggaaccca gagcagcagt acccatagca ggagtgtgtc

60

tgtctccatg gtgg

74

<210> 24

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide reverse primer

<400> 24

gatcttcaat ttttttcnna tcaattatta cattcac

37

<210> 25

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide forward primer

<400> 25
ctgggtgaat gtantaagtg atttgaaaa aattga 36

<210> 26

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> construct comprising NheI and Ig-kappa-Leader and WT-IL-15 and Bg
III

<400> 26
ctagccacca tggagacaga cacactcctg ctatgggtac tgctgctctg ggttccaggt 60
tccactgggtg acaactgggt gaattgtaata agtgatttga aaaaaattga a 111

<210> 27

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide reverse primer

<400> 27
ggatcagaag tgttgatgaa catttggaca atatgtacaa aactctgcaa aattc 55

<210> 28

Empfangszeit 14. Okt. 18:08

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide reverse primer

<400> 28

gggatccgaa gtgttgatga acatttgga

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide forward primer

<400> 29

atlaagatc ttattcaatc tatgc

29

25

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.